

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СПОРОЗОИТАМИ *EIMERIA TENELLA*  
(COCCIDHIA, SPOROZOA) [ $^{14}\text{C}$ ]АСПАРАГИНОВОЙ  
И [ $^{14}\text{C}$ ]ОРОТОВОЙ КИСЛОТ ДЛЯ БИОСИНТЕЗА  
ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

Ю. М. Крылов

Лаборатория биохимии и радиобиологии Всесоюзного научно-исследовательского ветеринарного института птицеводства МСХ СССР, Ленинград

С использованием радиоизотопного метода и ингибиторного анализа показано, что спорозоиты кокцидий *Eimeria tenella* синтезируют пиримидиновые нуклеотиды de novo, используют экзогенные [ $^{14}\text{C}$ ] аспарагиновую и [ $^{14}\text{C}$ ]оротовую кислоты. Синтезируют РНК до проникновения в клетку.

Сведения о метаболизме паразитических простейших представляют определенный интерес для понимания физиологической эволюции и могут быть использованы как теоретическая основа в практических целях для синтеза ингибиторов. Паразитические простейшие для биосинтеза нуклеиновых кислот используют пиримидиновые нуклеотиды. Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов у эукариот осуществляется двумя метаболическими путями: de novo из аспарагиновой кислоты и карбамоилфосфата, по другому пути из готовых пиримидиновых оснований и нуклеозидов, образующихся при катаболизме нуклеиновых кислот. Этот путь называют либо «спасительным», либо «путем синтеза из обломков» (Корнберг, 1977).

Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов из оснований и нуклеозидов у кокцидий рода *Eimeria* изучен достаточно хорошо. В ряде работ (Roberts e. a., 1970; Ouellette e. a., 1973, 1974; Maybery, Maquardt, 1974; Morgan, Canning, 1974; Хованских, 1979) было показано, что в процессе эндогенного развития кокцидии рода *Eimeria* используют пиримидиновые основания урацил и цитозин, нуклеозиды уридин и цитидин в готовом виде, тимин и тимидин в готовом виде не используются. Тимидилат, необходимый для биосинтеза ДНК, образуется из дезоксиуридилата через тимидилатсинтетазную реакцию (Ouellette e. a., 1974; Jones, 1980). Что же касается пути биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов de novo, то у кокцидий рода *Eimeria* он не изучен.

Хованских (1979) показал, что эндогенные стадии развития кокцидий ассимилируют оротовую кислоту из организма хозяина. Этот факт предполагает существование у кокцидий рода *Eimeria* метаболического пути, превращающего оротовую кислоту в пиримидиновые нуклеотиды. Остается неясным, синтезируют ли кокцидии рода *Eimeria* пиримидиновые нуклеотиды de novo из аспарагиновой кислоты и карбамоилфосфата, используется ли оротовая кислота для синтеза пиримидиновых нуклеотидов.

Известно, что у эукариотов начальные и промежуточные метаболиты пути биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов de novo идентичны, видовые различия заключаются в свойствах ферментов, участвующих в метаболических реакциях, их молекулярной организации и клеточной локализации (Jones, 1972; Gutteridge e. a., 1978). Таким образом, общая схема пути биосин-

теза пиримидиновых нуклеотидов de novo может быть представлена в виде следующей цепочки последовательных превращений: синтез карбамоилфосфата → карбамоилфосфат+L-аспарагиновая кислота → карбамоиласпартат → дигидрооротовая кислота → оротовая кислота → оротовая кислота+фосфорибозилпирофосфат → оротидин-5'-фосфат → уридин-5'-фосфат → пиримидиновые нуклеотиды (дифосфаты) → уридин-5'-трифосфат (УТФ), цитидин-5'-трифосфат (ЦТФ), дезоксицитидин-5'-трифосфат (дЦТФ), дезокситимидин-5'-трифосфат (дТТФ) → нуклеиновые кислоты.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для решения вопроса о способности кокцидий рода *Eimeria* синтезировать пиримидиновые нуклеотиды de novo и использовать оротовую кислоту для биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов был применен радиоизотопный метод в сочетании с ингибиторным анализом. Существующие методические трудности получения эндогенных стадий развития кокцидий без метаболически активных примесей не позволяют использовать их для решения данного вопроса. Поэтому в опытах использовали экзогенную стадию развития кокцидий спорозоиты, которые способны синтезировать белки и ассимилировать субстраты (Жрылов, Сванбаев, 1980) и могут быть получены в достаточном для работы количестве без метаболически активных примесей, могут длительное время существовать во внеклеточном состоянии.

В опытах были использованы спорозоиты *Eimeria tenella* штамм Л-1-23, полученные из ооцист модифицированным методом Райли и Доран (Ryley 1973; Doran, 1973). От примеси оболочек ооцист и спороцист спорозоиты отмывали центрифугированием (250g 10 мин). Опыты и выделение спорозоитов проводили в условиях, исключающих присутствие и развитие микрофлоры. Для инкубации спорозоитов с радиоактивными предшественниками и ингибитором использовали смесь, состоящую из 1.5 мл среды 199 и 1 мл 0.025 М трис-НСl буфера рН 7.8, содержащего хлористый натрий, хлористый кальций и хлористый калий, кроме того, обе компоненты содержали бензилпенициллин натрия и сульфат стрептомицина по 1 мг/мл. Жизнеспособность спорозоитов контролировалась микроскопически, количество спорозоитов определялось в камере Горяева. В качестве низших предшественников пиримидиновых нуклеотидов использовали D,L-[4-<sup>14</sup>C]аспарагиновую кислоту и [2-<sup>14</sup>C]оротовую кислоту, удельной радиоактивностью 29.3 мК/мМ и 26.25 мК/мМ соответственно, которые вносились в инкубационную среду по 5 мК/мМ. [2-<sup>14</sup>C]оротовую кислоту предварительно переводили в натриевую соль. О включении предшественников в пиримидиновые нуклеотиды судили по величине удельной радиоактивности РНК. Для доказательства того, что меченый предшественник используется для биосинтеза пиримидинового гетероцикла использовали ингибитор-6-азаурацил, который в организме превращается в 6-азауридин-5'-фосфат и ингибирует оротидин-5'-фосфат-декарбоксилазу (К. Ф. 4.1.1.23.) фермент пути биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов de novo, превращающий оротидин-5'-фосфат в уридин-5'-фосфат (Pasternak, Handshumacher, 1959; Handshumacher, 1960). Концентрация ингибитора в инкубационной среде 10 мК/мМ, продолжительность инкубации 60 мин при температуре 41° С. Спорозоиты вносили в инкубационную смесь в солевом 0.025 М трис-НСl буфере рН 7.8. В опытах по изучению использования [<sup>14</sup>C]оротовой кислоты для биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов количество спорозоитов в среде равнялась 1.12·10<sup>6</sup> спорозоитов в 2.5 мл, а при использовании [<sup>14</sup>C]аспарагиновой кислоты — 1.25·10<sup>6</sup> спорозоитов в 2.5 мл. После окончания инкубации спорозоиты осаждали центрифугированием и трижды промывали осадок соевым 0.025 М трис-НСl буфером рН 7.8 (2000g 10 мин при 0°). Из осадка спорозоитов экстрагировали РНК методом горячей фенольной экстракции с ДСН, депротеинизировали. Дважды переосаждали этанолом с ацетатом натрия при минус 15°. Количество РНК определяли орциновым методом, аналитическую чистоту препаратов РНК определяли спектрофотометрически. Пробы РНК отвечали аналитическим требованиям чистоты. Радиоактивность проб РНК определяли жидкостно-сцинтилляционным методом в сцинтилляторе Брея на жидкостно-сцинтилля-

ционной системе «Марк III» (Нуклеар Чикаго, США) в DPM и выражали в расп/мин/мкг РНК. Полученные результаты были обработаны методом непрямых разностей с использованием фактора Молденгауэра и критерия Стьюдента. Рассчитывались следующие показатели: средняя арифметическая ( $M$ ), ошибка средней арифметической ( $m$ ), степень достоверности ( $P$ , в %). Результаты опытов статистически достоверны ( $P < 0.1\%$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении способности спорозоитов синтезировать пиримидиновые нуклеотиды *de novo*, используя [ $^{14}\text{C}$ ]аспарагиновую кислоту, были получены следующие результаты. При инкубации спорозоитов в течение 60 мин в среде, содержащей D,L-[4- $^{14}\text{C}$ ]аспарагиновую кислоту, радиоактивность проб РНК колебалась от 10 109 расп/мин/мкг до 14 226 расп/мин/мкг, средняя величина ( $n=10$ ) составляла ( $M \pm m$ )  $12\,306 \pm 577$  расп/мин/мкг. При введении в состав инкубационной среды 6-азаурацила радиоактивность РНК колебалась от 2708 расп/мин/мкг до 3794 расп/мин/мкг, средняя величина ( $n=10$ ) составляла ( $M \pm m$ )  $3232 \pm 133$  расп/мин/мкг. Процент ингибирования включения [ $^{14}\text{C}$ ]аспарагиновой кислоты в пиримидиновые нуклеотиды РНК под действием 6-азаурацила составил 73.74%.

При инкубации спорозоитов с [2- $^{14}\text{C}$ ]оротовой кислотой радиоактивность РНК колебалась от 2779 расп/мин/мкг до 3515 расп/мин/мкг, средняя величина ( $n=10$ ) составляла ( $M \pm m$ )  $3140 \pm 131$  расп/мин/мкг. При введении в состав инкубационной среды 6-азаурацила радиоактивность РНК колебалась от 483 расп/мин/мкг до 610 расп/мин/мкг, средняя величина ( $n=10$ ) составляла ( $M \pm m$ )  $524 \pm 16$  расп/мин/мкг. Процент ингибирования включения [ $^{14}\text{C}$ ]оротовой кислоты в пиримидиновые нуклеотиды РНК составил 83.22%.

Выделение радиоактивной РНК при инкубации спорозоитов в среде, содержащей D,L-[4- $^{14}\text{C}$ ]аспарагиновую кислоту, и уменьшение удельной радиоактивности РНК при введении в состав инкубационной среды 6-азаурацила на 73.74% свидетельствует о способности спорозоитов синтезировать пиримидиновые нуклеотиды *de novo*. Доказательством того, что аспарагиновая кислота используется спорозонтами для биосинтеза пиримидинового гетероцикла является уменьшение величины удельной радиоактивности РНК под действием 6-азаурацила, ингибирующего путь биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов *de novo*. Выделение радиоактивной РНК при инкубации спорозоитов с [2- $^{14}\text{C}$ ]оротовой кислотой и уменьшение удельной радиоактивности РНК при введении в состав инкубационной среды 6-азаурацила свидетельствует о том, что оротовая кислота включается в метаболический путь биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов *de novo* как промежуточный метаболит. Тот факт, что введение 6-азаурацила в состав инкубационной смеси приводит к снижению величины удельной радиоактивности РНК, свидетельствует о его превращении в 6-азауридин-5'-фосфат. Превращение 6-азаурацила в 6-азауридин-5'-фосфат осуществляется теми же ферментативными системами, что и урацила в уридин-5'-фосфат (Pasternak, Handshumacher, 1959; Handshumacher, 1960), что указывает на способность спорозоитов синтезировать пиримидиновые нуклеотиды и из готовых пиримидиновых оснований.

Обобщая полученные результаты о способности спорозоитов *Eimeria tenella* синтезировать пиримидиновые нуклеотиды из аспарагиновой кислоты и оротовой кислоты, а также результаты исследований Робертса и соавторов (Roberts e. a., 1970), Оулета и соавторов (Ouellette e. a., 1973, 1974), Майбери и Маквардта (Maybery, Maquardt, 1974), Моргана и Канинга (Morgan, Canning, 1974), Хованских (1979), можно заключить, что у кокцидий рода *Eimeria* существует два метаболических пути, обеспечивающих процессы биосинтеза ДНК и РНК пиримидиновыми нуклеотидами: один — биосинтез *de novo* из аспарагиновой кислоты и карбамоилфосфата, другой — «синтез из обломков», использующий продукты деградации нуклеиновых кислот: основания — урацил, цитозин и нуклеозиды — уридин, цитидин. Таким образом, УТФ, ЦТФ, дЦТФ и дТТФ могут быть синтезированы паразитом из урацила и уридина — метаболический путь биосинтеза из «обломков», и из аспарагиновой кислоты и

оротовой кислоты — путь биосинтеза de novo. Цитидин используется только для биосинтеза ЦТФ и дЦТФ.

Метаболический путь биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов de novo у кокцидий рода *Eimeria* по используемым субстратам не отличается от такового у других представителей типа Sporozoa *Plasmodium* spp. (Gutteridge, Trigg, 1970; Hill e. a., 1979; O'Sullivan, Ketley, 1980), *Toxoplasma gondii* (Yoneda e. a., 1979), *Babesia* spp. (Irwin, Yong, 1979), у представителей типа Mastigophorae (Kidder e. a., 1976; Hammond, Gutteridge, 1980), у грибов и млекопитающихся (Jones, 1972).

Использование спорозонтами экзогенных субстратов для биосинтеза белков (Крылов, Сванбаев, 1980), пиримидиновых нуклеотидов и РНК в условиях in vitro, приближающихся по составу, pH и температуре к условиям в тонком кишечнике хозяина, позволяет предположить, что аналогичные процессы ассимиляции и биосинтеза макромолекул протекают у паразита во время его миграции в просвете кишечника.

Существование у кокцидий рода *Eimeria* метаболического пути биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов de novo открывает новые возможности для целенаправленного синтеза антикокцидийных препаратов. Наибольший интерес с этой точки зрения представляют стадии биосинтеза карбамоиласпартата, дигидрооротовой и оротовой кислот, оротидин-5'-фосфата.

Ингибирование метаболического пути биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов de novo приведет к снижению пластических и энергетических возможностей паразита.

#### Литература

- Корнберг А. Синтез ДНК. М., Мир, 1977. 359 с.
- Крылов Ю. М., Сванбаев Е. С. Использование спорозонтами *Eimeria tenella* (Coccidia, Sporozoa) экзогенного  $^{14}\text{C}$ -глицина для синтеза белков. — Паразитология, 1980, т. 14, вып. 6, с. 531—533.
- Хованских А. Е. Биохимические основы паразито-хозяйственных взаимоотношений при кокцидиозах кур. — Автореф. докт. дис. М., 1979. 32 с.
- Doran D. J. Excysting sporozoites. — In: The Coccidia/Ed. D. H. Hammond and P. L. Long. Baltimore. University Park Press, London, Butterworths, 1973, p. 432—434.
- Gutteridge W. E., Trigg P. I. Incorporation of Radioactive Precursors into DNA and RNA of *Plasmodium knowlesi* in vitro. — J. Protozool., 1970, vol. 17, N 1, p. 89—96.
- Gutteridge W. E., Dave D., Richards W. H. G. Conversion of dihydroorotate to orotate in parasitic protozoa. — Biochim. et biophys. Acta, 1978, vol. 582, N 3, p. 390—401.
- Hammond D. J., Gutteridge W. E. Enzyme of pyrimidine biosynthesis *Trypanosoma cruzi*. — The Third European multicolloquium of parasitology, Cambridge, England, 1980, p. 17.
- Handshumacher R. E. Orotidylic acid decarboxylase: Inhibition studies with azauridine-5'-phosphate. — J. Biol. Chem., 1960, vol. 235, N 10, p. 2917—2919.
- Hill B., Kilsby J., Ginger G. D. Pyrimidine metabolism in *Plasmodium berghei*. — J. Protozool., 1979, vol. 26, N 3, Pt 1, N 223, p. 74A.
- Irvin A. D., Young E. R. Further studies on the uptake of tritiated nucleic acid precursors by *Babesia* spp. of cattle and mice. — Int. J. Parasitol., 1979, vol. 9, N 2, p. 109—114.
- Jones S. Isolation of second-generation schizont of avian coccidia and their use in biochemical investigation. — Parasitology, 1980, vol. 80, Pt 2, p. 301—312.
- Jones M. E. Regulation of Uridylic Acid Biosynthesis in Eukaryotic Cells. — Current Topics in Cellular Regulation/Ed. B. Horecker, E. R. Stadman. New York, Acad. Press, 1972, vol. 6, p. 227—265.
- Kidder G. W., Dewey V. C., Nolon L. L. Enzyme of orotate biosynthetic pathway in *Critidia fasciculata*. — Can. J. Biochem., 1976, vol. 54, N 1, p. 32—41.
- Mayberry L. F., Maquardt W. C. Nucleic acid precursor incorporation by *Eimeria nieschulzi* (Protozoa; Apicomplexa) and jejunal villus epithelium. — J. Protozool., 1974, vol. 21, N 4, p. 599—603.
- Morgan K., Canning E. U. Incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine and  $^3\text{H}$ -adenosine by *Eimeria tenella* grown in chick embryos. — J. Parasitol., 1974, vol. 60, Pt 2, p. 364—367.
- O'Sullivan W. J., Ketley K. Biosynthesis of uridine monophosphate in *Plasmodium berghei*. — Ann. Trop. Med. and Parasitol., 1980, vol. 72, N 2, p. 109—114.
- Ouellette C. A., Strout R. G., McDougald L. R. Incorporation of radioactive pyrimidine nucleoside into DNA and RNA of *Eimeria tenella* (Coccidia) cultures in vitro. — J. Protozool., 1973, vol. 20, N 1, p. 150—153.
- Ouellette C. A., Strout R. G., McDougald L. R. Thymidylic acid synthesis in *Eimeria tenella* (Coccidia) cultured in vitro. — J. Protozool., 1974, vol. 21, N 2, p. 398—400.

- P a s t e r n a k C. A., H a n d s h u m a c h e r R. E. The Biochemical Activity of 6-azauridine: Interference with Pyrimidine Metabolism in Transplantable Mouse Tumors. — J. Biol. Chem., 1959, vol. 234, N 11, p. 2992—2997.
- R o b e r t s W. L., E l s n e r Y. Y., S h i g e m a t s u A., H a m m o n d D. M. Lack of Incorporation of <sup>3</sup>H-Thymidine into *Eimeria callospermophili* in Cell Cultures. — J. Parasitol., 1970, vol. 56, N 4, p. 833—834.
- R y l e y J. F. Oocyst isolation techniques. — In.: The Coccidia/Ed. D. H. Hammond P. L. Long. Bultimore. University Park Press, London. Butterworths, 1973, p. 425—428.
- Y o n e d a S., C a s t e l l a n i B. R., U e m u r a K., R a d t k e B. M. Autoradiographic study on the pyrimidine metabolism of *Toxoplasma gondii*, in its extracellular forms. — Rev. Brasil. Biol., 1979, vol. 39, N 3, p. 653—655.
- 

THE USE OF <sup>14</sup>CASPARTIC AND <sup>14</sup>COROTIC ACIDS BY SPOROZOITES  
OF *EIMERIA TENELLA* (SPOROZOA, COCCIDIIDA) FOR SYNTHESIS  
OF PYRIMIDINE NUCLEOTIDES

Ju. M. Krylov

S U M M A R Y

Radioisotopic method has shown that sporozoites of *Eimeria tenella* use exogenic <sup>14</sup>Caspartic and <sup>14</sup>Corotic acids for biosynthesis of pyrimidine nucleotides de novo, synthesize RNA. Metabolic pathway of biosynthesis of pyrimidine nucleotides in coccidia of the genus *Eimeria* are discussed.

---